

消癌解毒方对 W256 荷瘤大鼠抑瘤及生存期的影响

杨静^{1,2}, 陈海彬¹, 周红光¹, 吴勉华^{1*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023; 2. 徐州市中医院肿瘤内科, 江苏 徐州 221003)

摘要:目的 观察消癌解毒方对大鼠 W256 癌肉瘤抑制作用及其生存改善作用。方法 W256 癌肉瘤大鼠随机分为空白组、模型组、顺铂治疗组和消癌解毒方高、中、低剂量治疗组, 观察大鼠生存期、体质量、摄食量、计算抑瘤率, 采用酶联免疫分析法测定大鼠血清中 TNF- α 、TGF- β 的含量。结果 消癌解毒方能抑制瘤体生长($P < 0.05 \sim 0.01$), 延长荷瘤大鼠生存时间($P < 0.05 \sim 0.01$), 改善恶液质状态并以高剂量中药组疗效最优。此外消癌解毒方还能显著降低荷瘤大鼠血清中 TNF- α 、TGF- β 的含量($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论 消癌解毒方能抑制肿瘤生长, 延长大鼠生存期的作用, 其疗效可能与其免疫调节作用有关。

关键词: 消癌解毒方; 肿瘤生长; 生存期; W256 肉瘤细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2015)01-0052-03

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2015.0052

Impact of Xiaoi Jiedu Fang on Tumor Growth and Survival in Carcinosarcoma W256 Tumor-bearing Rats

YANG Jing^{1,2}, CHEN Hai-bin¹, ZHOU Hong-guang¹, WU Mian-hua^{1*}

(1. The First Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Department of Medical Oncology, Xuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuzhou, 221003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of Xiaoi Jiedu Fang on carcinosarcoma W256 inhibition and survival improvement in rats. **METHODS** Rats were randomly divided into the control group, model group, cisplatin group, as well as high, medium and low dose groups of Xiaoi Jiedu Fang. The survival, body weight and food intake of rats were measured, inhibitory rates of tumor growth were calculated, and the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β (TGF- β) in rat serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS** Xiaoi Jiedu Fang inhibited tumor growth($P < 0.05 \sim 0.01$) and improved the survival and cachectic state of tumor-bearing rats($P < 0.05 \sim 0.01$). The therapeutic activity of high-dose group was optimal. Xiaoi Jiedu Fang also significantly reduced the levels of serum TNF- α and TGF- β in tumor-bearing rats($P < 0.05 \sim 0.01$). **CONCLUSION** Xiaoi Jiedu Fang can inhibit tumor growth and improve the survival rates of rats. The therapeutic activities are possibly related to its immunomodulatory effects.

KEY WORDS: Xiaoi Jiedu Fang; tumor growth; survival; carcinosarcoma W256 cells

恶性肿瘤是目前危害人类健康的主要疾病之一。其发病机理及治疗方法的研究已成为国内外医学研究的热点。长期以来, 中医药在治疗肿瘤方面取得了一定的临床疗效。

消癌解毒方是我国国医大师周仲瑛教授总结的临床长期应用确有疗效的名医方药, 课题组前期研究总结了从“癌毒”辨治肿瘤的经验及诊疗方法^[1], 证实了“癌毒”在肿瘤临床证候中的客观存在, 验证了“癌毒”病机指导下形成的抗癌方疗效。本文就该方对 W256 荷瘤大鼠移植瘤的抑制作用及改善生存期作用进行初步研究。

1 材料

1.1 实验动物及细胞株

W256 瘤株购于上海拜力生物公司, Wistar 大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。动物生产许可证号: SCXK(沪)2013-0005, 使用许可证号: SYXK(苏)2013-0030, 饲料购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场。

1.2 药物与试剂

消癌解毒方由白花蛇舌草、僵蚕、蜈蚣、八月扎等中药按特定剂量比例组成, 为周仲瑛教授原创组方, 其各味中药均购自安徽省亳州市中西药有限公

收稿日期: 2014-10-06; 修稿日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81102563); 教育部博士点博导类基金资助项目(20113237110001)

作者简介: 杨静(1976—), 女, 江苏徐州人, 南京中医药大学 2012 级博士研究生, 徐州市中医院副主任医师。* 通信作者: wmh7001@163.com

司(经南京中医药大学严辉博士鉴定),由南京中医药大学药理教研室煎制,浓缩成生药量为 2 g/mL 药液,保存备用。顺铂注射液购自南京制药厂有限公司(批号:20131118)。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司);DLF560 型超净工作台(荷兰 ClearAir Techniek bv 公司);细胞培养瓶(加拿大 BIOFIL 公司);SUN2R ISE 自动酶标仪(奥地利 TECAN 公司);十万分之一电子天平(德国赛多利斯)。

2 方法

2.1 动物模型的建立

Wistar 大鼠腹腔接种瘤株后 5~8 d 长成腹水型荷瘤鼠。抽取癌性腹水(多呈黄色或血色浑浊悬液)20 mL,以 1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,用生理盐水洗涤、离心 2 次(2 000 r/min,5 min),取稀糊状浓缩的瘤细胞悬液备用。实验用 Wistar 大鼠术前禁食 6~8 h,大鼠水合氯醛麻醉后仰卧固定,备皮、脱毛、局部安尔碘消毒,用 1 mL 注射器先抽取空气 0.1 mL 再使注射器垂直,抽取浓缩的瘤细胞悬液 0.05 mL,针头与肝脏表面呈 30°斜刺入鼠右前腋下约 0.8 cm,缓缓注入瘤细胞悬液 0.05 mL 后继续推入空气 0.03 mL,快速拔针以防止瘤细胞悬液顺针道逆流,穿刺点用棉签适当压迫 5 min,再次局部消毒。

2.2 消癌解毒方对 W256 移植瘤抑瘤率的影响

Wistar 大鼠 50 只,雄性,分为 5 组,每组 10 只,即模型对照组(生理盐水灌胃),顺铂组(腹腔注射,1 mg/(kg·d));消癌解毒方高、中、低剂量组(90、30、10 g/(kg·d))。以上剂量均依据成人临床拟用量,通过体表面积换算求得。造模后 7 d 出瘤,开始给药。第 15 天剥取实体瘤并称质量,按以下公式计算瘤质量系数及抑瘤率,并进行组间 *t* 检验。

抑瘤率= $\frac{\text{对照组瘤质量}-\text{用药组瘤质量}}{\text{对照组瘤质量}} \times 100\%$ 。

2.3 生存期实验

另选 Wistar 大鼠 60 只,雄性,分为 6 组,每组 10 只,即空白对照组、模型对照组、顺铂组、药物高、中、低剂量组。造模后 7 d 出瘤,开始给药。每日给药 1 次,连续 28 d。荷瘤大鼠的生存时间约 8~9 周,故观察周期持续至第 9 周。

观察指标:①摄食量:每日定时定量给予标准饲料,至次日收集剩余饲料。饲料摄入量=前 1 天饲

料质量-后 1 天饲料质量。观察同时毛色情况,嗜睡,疲倦情况;②荷瘤大鼠存活时间,按以下公式计算生存延长率,并进行组间 *t* 检验。

生存延长率= $\frac{\text{用药组存活天数}-\text{模型组存活天数}}{\text{模型组存活天数}} \times 100\%$ 。

2.4 ELISA 检测 TNF-α 和 TGF-β

采用眼眶后静脉丛取血方法取新鲜血液置于 4℃,静置 4 h,3 500 r/min 室温离心 10 min,吸取上层清液,严格按照大鼠 TNF-α、TGF-β 酶联免疫分析检测试剂盒说明书操作。在酶标仪 450 nm 处读取 OD 值,通过标准曲线获取血清中 TNF-α 和 TGF-β 的浓度。

2.5 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,根据方差齐性采用单因素方差分析和 *q* 检验比较各组间差异,*P*<0.05~0.01 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 消癌解毒方对荷瘤大鼠肿瘤生长的影响

通过测定各组大鼠瘤体实块质量,计算抑瘤率。与对照组比较,消癌解毒方高剂量组、顺铂组对 W256 移植瘤的生长均具有较强的抑制作用(*P*<0.05~0.01),并以消癌解毒方高剂量组效果最好(抑瘤率为 47.6%)。

表 1 消癌解毒方对 W256 大鼠瘤质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组	18.21±1.56	—
顺铂组(1 mg/kg)	5.91±0.54**	67.5
消癌解毒方(90 mg/kg)	9.54±1.29**	47.6
消癌解毒方(30 mg/kg)	12.93±1.86*	28.9
消癌解毒方(10 mg/kg)	15.99±2.11	12.2

注:与模型组相比,**P*<0.05,***P*<0.01。

3.2 消癌解毒方对荷瘤大鼠摄食、体质量及存活时间的影响

各组动物在给药后的 4~5 d,局部可触及大小不一的皮下小结节。接种后 1 周,各荷瘤组均出现瘤块,小鼠明显消瘦,出现厌食、虚弱、衰竭、体质量下降至与正常对照组有显著性差异时,即进入恶病质状态。模型组最为明显(表 2~3)。消癌解毒方中,高剂量组的摄食量较模型组显著增加(*P*<0.05~0.01),中、高剂量组体质量显著高于模型组(*P*<0.05~0.01)。顺铂组动物摄食量较少,体质量最轻,可能是由于顺铂的副作用所致。

表 2 造模用药前后大鼠摄食变化($\bar{x} \pm s, g, n=10$)

组别	造模前 1 d	造模后 1 周	造模后 2 周	造模后 3 周	造模后 4 周
空白组	13.07±0.44	12.78±1.23	12.85±1.14	12.67±0.72	12.92±0.16
模型组	13.12±1.25	8.76±1.11	7.24±0.87	5.97±0.68	3.18±0.45
顺铂组(1 mg/kg)	12.87±0.89	5.25±1.21*	4.48±1.05**	3.23±0.59**	4.15±0.35*
消癌解毒方(90 mg/kg)	13.63±2.14	10.66±0.87	9.82±0.98*	7.38±0.58*	6.27±0.54**
消癌解毒方(30 mg/kg)	13.25±1.89	9.23±1.12	8.08±0.84	6.53±0.74	5.68±0.61**
消癌解毒方(10 mg/kg)	12.83±1.59	9.49±1.34	7.63±0.47	6.17±0.65	4.42±0.34*

注:与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 造模用药前后大鼠体质量变化($\bar{x} \pm s, g, n=10$)

组别	造模前 1 d	造模后 4 周
空白组	249.4±4.57	318.7±7.10
模型组	248.5±9.02	189.3±8.47
顺铂组(1 mg/kg)	250.3±7.24	191.8±5.69
消癌解毒方(90 mg/kg)	249.2±6.16	204.6±5.54**
消癌解毒方(30 mg/kg)	250.2±7.07	197.8±4.59*
消癌解毒方(10 mg/kg)	250.2±6.34	194.2±5.49

注:与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

此外消癌解毒方高、中、低剂量组荷瘤大鼠的存活时间均有一定的延长,其中,高、中剂量组的生命延长率达 30% 以上。见表 4。

表 4 消癌解毒方对 W256 荷瘤大鼠存活时间的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	存活时间/d	生存延长率/%
模型组	48.00±3.43	—
顺铂组(1 mg/kg)	61.8±5.37**	50
消癌解毒方(90 mg/kg)	59.78±4.43**	48.6
消癌解毒方(30 mg/kg)	56.05±2.24*	40.2
消癌解毒方(10 mg/kg)	53.50±3.53*	23.4

注:与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.3 消癌解毒方对荷瘤大鼠外周血 TNF- α 和 TGF- β 表达的影响

模型组血清中 TNF- α 、TGF- β 浓度均明显高于空白组大鼠($P<0.01$);与模型组比较,消癌解毒方高剂量组的 TNF- α 、TGF- β 的表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),结果见表 5。

表 5 消癌解毒方对 W256 荷瘤大鼠血清 TNF- α 和 TGF- β 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	TGF- β /(ng·mL ⁻¹)
空白组	187.5±16.8	121.8±11.4
模型组	251.6±26.5**	168.4±20.9**
顺铂组(1 mg/kg)	165.8±14.2 [#]	124.3±18.2 [#]
消癌解毒方(90 mg/kg)	212.2.63±21.6 [#]	136.7±9.9 [#]
消癌解毒方(30 mg/kg)	241.1±18.8	152.1±13.6
消癌解毒方(10 mg/kg)	232.2±21.6	160.6±12.2

注:与空白组相比,* $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

4 讨论

以中医理论为基础治疗恶性肿瘤是基于对机体进行整体调节,发挥多层次、多环节、多靶点的综合作用,已经受到越来越多的重视^[2]。消癌解毒方是国医大师周仲瑛教授根据恶性肿瘤“痰瘀郁毒、阴伤气耗”这一基本病机,以“消癌解毒,益气养阴”为法,选择白花蛇舌草、僵蚕、蜈蚣、八月扎等按特定比例组成,全方扶正祛邪,攻补兼施^[3-4]。

本研究表明消癌解毒方能明显抑制荷瘤大鼠的实体瘤增殖、改善食欲、稳定体质量,延长存活时间,并且具有干预免疫抑制相关细胞因子 TNF- α 、TGF- β 表达的作用。其抗肿瘤物质基础及免疫调节作用机制尚需进一步地深入研究。

参考文献:

[1] 陈海彬,周红光,程海波,等.消癌解毒方对中老年恶性肿瘤患者免疫功能的影响[J].南京医科大学学报,2009,29(9):1257-1259.
Chen HB, Zhou HG, Cheng HB, et al. Immune function of Xi-aaijiedufang on patients with advanced malignant tumor[J]. J Nanjing Med Univ, 2009, 29(9): 1257-1259.
[2] 何光星,刘洁,王笏,等.中医药抗肿瘤作用机理研究现状[J].四川中医,2008,26(8):47-50.
He GX, Liu J, Wang J, et al. Research progress of TCM on anti-tumor mechanism[J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2008, 26(8): 47-50.
[3] 陈四清,张成铭,叶丽红.消癌扶正法治疗肝癌介入后复发[J].江苏中医药,2007,39(2):42-43.
Chen SQ, Zhang CM, Ye LH. Treatment of recurrence of hepatocarcinoma after intervention therapy by reinforcing body resistance[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2007, 39(2): 42-43.
[4] 叶丽红,顾勤,周仲瑛教授的肿瘤观[J].中国中医药信息杂志,2002,9(3):63-64.
Ye LH, Gu Q. Professor Zhou zhongying's opinion on tumor[J]. Chin J Inform Tradit Chin Med, 2002, 9(3): 63-64.

(编辑:董宇)